二斑叶螨抗螺螨酯品系 GST 基因的克隆与表达分析

吕娟娟[1]，王进军[2]，张寿芳[1]，沈慧敏[1,*]

(1. 甘肃农业大学草业学院，草业生态系统省部共建教育部重点实验室，中-美草地畜牧业可持续发展中心，兰州 730070；2. 西南大学植物保护学院，昆虫学及害虫控制工程重点实验室，重庆 400716)

摘要：【目的】揭示二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 对螺螨酯的分子抗性机理。【方法】利用 RT-PCR 克隆了二斑叶螨的谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST)基因 cDNA 全长序列，采用生物信息学软件分析了克隆基因的编码蛋白特性；利用实时荧光定量 PCR 方法分析 GST 基因在二斑叶螨的螺螨酯抗性与敏感品系中的表达差异。【结果】克隆获得的谷胱甘肽-S-转移酶 2 个基因分别被命名为 *TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2 (GenBank 登录号分别为：KC445659 和 KC445660)。序列分析发现，*TuGSTd*1 的开放阅读框长度为 648 bp，编码 215 个氨基酸，分子量约为 24.47 kDa，理论等电点为 5.49；*TuGSTd*2 的开放阅读框为 648 bp，编码 215 个氨基酸，分子量约为 24.57 kDa，理论等电点为 6.33。系统发育分析表明这两个基因与桔全爪螨 *Panonychus citri* Delta 家族的 GST 基因的氨基酸序列一致性为 93%。实时荧光定量 PCR 结果表明，*TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2 在二斑叶螨抗螺螨酯品系中的相对表达量分别为敏感品系的 5.60 和 3.75 倍。【结论】GST 基因在二斑叶螨抗螺螨酯品系中的相对表达量均显著高于敏感品系，据此推测 GST 基因的过量表达可能与其对螺螨酯的抗性形成有关。

关键词：二斑叶螨；抗螺螨酯品系；GST；基因克隆；表达量；荧光定量 PCR

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2013)04-0438-08

Cloning and expression profiling of glutathione S-transferase genes in the spirodiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

LÜ Juan-Juan[1], WANG Jin-Jun[2], ZHANG Shou-Fang[1], SHEN Hui-Min[1,*] (1. Sino-U. S. Centers for Grazingland Ecosystem Sustainability, Key Laboratory of Grassland Ecosystem Education Ministy, College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Key Laboratory of Entomology and Pest Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 【Aim】In order to clarify the resistance mechanism of *Tetranychus urticae* to spirodiclofen at the molecular level. 【Methods】The full-length cDNAs of GST genes of *T. urticae* were cloned by RT-PCR, the structure and function of the coded proteins were analyzed by bioinformatic software, and the expression levels of GST genes in the spirodiclofen-resistant (Sp-R) and susceptible (SS) strains of *T. urticae* were assayed by quantitative real-time PCR. 【Results】Two GST genes were cloned and named as *TuGSTd*1 and *TuGSTd*2, which were deposited in GenBank under the accession no. KC445659 and KC445660, respectively. The open reading frame of *TuGSTd*1 is 648 bp in length, encoding 215 amino acids with the predicted molecular mass of 24.47 kDa and the theoretical pI of 5.49, while that of *TuGSTd*2 is 648 bp in length, encoding 215 amino acids with the predicted molecular mass of 24.57 kDa and the theoretical pI of 6.33. Phylogenetic analysis showed that these two GST genes have 93% amino acid sequence identity with Delta class GSTs of *Panonychus citri*. Quantitative real-time PCR showed that the relative expression levels of *TuGSTd*1 and *TuGSTd*2 in Sp-R were 5.60 and 3.75 times as high as those in SS, respectively. 【Conclusion】The relative expression levels of GST genes in Sp-R were higher than those in SS, suggesting that the up-regulated expression of GST genes is probably related with the development of resistance to spirodiclofen in *T. urticae*.

Key words: *Tetranychus urticae*; spirodeclofen-resistant strain; glutathione S-transferase (GST); gene

基金项目：公益性行业(农业)科研专项 (201103020)；国家自然科学基金项目(31260442)

作者简介：吕娟娟，女，1986 年 9 月生，山东淄博人，研究方向为害虫(螨)抗药性，E-mail: lvjuanj@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ndshm@gsau.edu.cn

收稿日期 Received: 2012-11-19；接受日期 Accepted: 2013-03-03

cloning; expression level; real-time fluorescent quantitative PCR

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)是一类多基因家族编码的超家族酶系(余泉友等，2010)，能够催化多种内源的和外源的亲脂化合物与还原型谷胱甘肽的-SH 结合，中和亲电子中心，提高水溶性，降低细胞毒性。GST 是由分子量相同或近似的 26 kD 亚基组成的同源或异源二聚体，每一个亚基包含 2 个结构域，由 5～10 个氨基酸残基组成的可变连接区连接的 N 端结构域和 C 端结构域，N 端结构域含有较为保守的谷胱甘肽特异结合的 G 位点，C 端结构域含有可变性较大的结合疏水底物的 H 位点(Chen *et al*., 2003)。GSTs 主要分为微粒体型、线粒体型和胞质型三大类。而多数昆虫胞质 GSTs 可分为 Sigma，Omega，Zeta，Theta，Delta 和 Epsilon 6 个家族(Ketterman *et al*., 2011)。其中与杀虫剂抗性相关的为昆虫特异的 Delta 和 Epsilon 家族(Chelvanayagam *et al*., 2001)。GSTs 的主要功能是对异源有毒物质解毒，保护细胞免受氧化损伤和对激素、内、外源化合物进行细胞间运输。对昆虫 GSTs 功能的研究主要集中在对杀虫剂的解毒代谢和抗氧化方面。

二斑叶螨 *Tetranychus urticae* 是一种重要的世界性害螨。由于长期以来使用专一的杀螨剂且盲目、大量和连续使用，使其对多种化学杀螨剂均产生了不同程度的抗药性，使叶螨抗性进入极度的快速发展阶段，以致果树和蔬菜生产中很难找到高效防治药剂。近年来二斑叶螨成为甘肃省果树和蔬菜上的第一大害螨，严重影响着其果蔬业的发展。国内外关于螨类对螺螨酯抗性机理方面的研究报道尚少，Van Pottelberge 实验室筛选的已达到 274 倍的二斑叶螨抗螺螨酯品系，用荧光检测其 GSTs 活性显著增加，为敏感品系的 2.5 倍(Van Pottelberge *et al*., 2009)，可能与螺螨酯抗性相关。在螺螨酯的抗性监测中，经筛选的二斑叶螨品系 GSTs 的活性增加了 1.2 倍(Rauch and Nauen, 2003)。Niu 等(2012)研究表明，GSTs 可能参与了田间种群柑橘全爪螨对哒螨灵的解毒代谢。本实验室段辛乐等(2011)和符海波等(2011)已从生理生化方面对螺螨酯的抗性机制进行了研究，表明二斑叶螨对螺螨酯抗性主导机理可能与 GSTs 的活性增强有关。因此，为了延缓二斑叶螨对螺螨酯抗性的产生，延长药剂的使用寿命，本研究利用 RT-PCR 技术对二斑叶螨抗螺螨酯品系的 GST 基因进行克隆并分析了其在不同品系中的 mRNA 表达量，揭示二斑叶螨对螺螨酯的分子抗性机理，为其合理使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试螨类：敏感品系(susceptible strain, SS)，2007 年 6 月底采自甘肃省兰州市兴隆山国家级森林公园，不接触任何药剂的情况下采用雌雄单系(一雌一雄用叶碟法在培养皿中)繁殖饲养，将其后代转移到盆栽豇豆苗上在人工气候室内大量饲养约 40 代，作为二斑叶螨相对敏感品系来源；螺螨酯抗性品系(spirodiclofen-resistant strain, Sp-R)，由同源的相对敏感品系分出一部分个体，扩繁后用螺螨酯(spirodiclofen)在室内经 30 代汰选，获得了抗性倍数为 77.92 倍的室内抗性品系(段辛乐等，2011)。室内饲养条件为温度 26 ± 1℃，相对湿度 75% ± 5%，光周期 14L∶10D。

主要的试剂和仪器：RNeasy Plus Micro Kit 购自 Qiagen 公司，PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 及 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司，Gel Extraction MiniKit 购自上海华舜生物工程有限公司，克隆用的载体 pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司，感受态细胞 DH5α 购自北京全式金公司，定量用的 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 购自 Toyobo 公司。Universal Hood Ⅱ凝胶成像仪(Bio-Rad)，Mx3000P™定量 PCR 仪(Stratagene)。

1.2 总 RNA 提取及第一链 cDNA 的合成

分别挑取二斑叶螨螺螨酯抗性和敏感品系雌成螨(各品系大约 500 头)，在液氮中用研磨棒充分研磨后，参照 Qiagen 公司的 RNeasy Plus Micro Kit 试剂盒说明书提取总 RNA。对提取到的总 RNA 进行完整性检测。吸取 2 μL 总 RNA 在核酸蛋白质浓度测定仪 Nanovue(GE Healthcare)上测定其纯度。用 1% 的琼脂糖电泳胶电泳分离，经 GoldView 染色，检测其完整性。参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书将提取的 RNA 反转录为 cDNA。

1.3 引物的设计

参照二斑叶螨基因组序列(Grbic *et al*., 2011)设计用于 GST 基因扩增及定量表达研究的引物，详见表 1。

表 1 本研究所用的引物及用途

Table 1 Primers and their use in the experiment

目标基因 Target gene	引物序列(5′-3′) Primer sequences	扩增片段长度(bp) Length of amplified fragments	引物用途 Use of primers
*GST*1	F：ATGGTCCTCGAACTGTACCAATTAC R：TAGTTGGTGGAAAGAGTTGGT	595	GST1 基因扩增 Amplification of *GST*1
	F：TCAACCCTTTCCATTGTATCCC R：GTTTCCTTCGAGCTAGACTTGCTTAG	506	
*GST*2	F：ATGGTCATCGAACTGTATCAATTACCT R：ATTCTCGGAAATCTTTGATAGGGTC	625	GST2 基因扩增 Amplification of *GST*2
	F：AACATTCCCATTGAGACTAAACATC R：ATTCCTTCGAAATTGTTCTCGTTAA	576	
*GST*1	F：ACCCATGTCTGCTCCTTGTC R：TAAGTCATGATGGCCCCGACT	195	GST1 基因定量 Quantitative real-time PCR of *GST*1
*GST*2	F：CTTTCCACTGTATTCCGACCA R：TCCCAGTAAAGCCATCGTTC	157	GST2 基因定量 Quantitative real-time PCR of *GST*2

1.4 基因的扩增

以抗性品系的 cDNA 为模板，PCR 扩增目的基因。25 μL PCR 反应体系：cDNA 模板 1 μL、10 × PCR Buffer 2.5 μL、$MgCl_2$（25 mmol/L）2.5 μL、dNTPs Mixture（2.5 mmol/L）2 μL、上下游引物各 1 μL、DNA 聚合酶 0.25 μL、ddH_2O 14.75 μL。PCR 反应的条件：95℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，55℃复性 30 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。取 7 μL 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

1.5 PCR 产物的克隆与测序

按照胶回收试剂盒 Gel Extraction MiniKit（上海华舜）对目的条带进行纯化，纯化产物连接到 pGEM-T Easy Vector 上，再转化到感受态大肠杆菌中。在 LB 固体培养基（含有 Amp）平板上涂布 5 μL X-gal、5 μL IPTG，吸取 40～80 μL 菌液涂布于上述 LB 固体平板培养基上，倒置于 37℃温箱恒温培养。通过蓝白斑筛选，PCR 菌液鉴定阳性克隆送华大公司测序。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

定量 PCR 反应体系为：SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 10 μL、ddH_2O 7 μL、上下游引物（表 1）各 1 μL 及模板 cDNA 1 μL。反应条件：95℃预变性 2 min；95℃变性 15 s，60℃退火 30 s，延伸 30 s，40 个循环；在 60℃～95℃下进行融解曲线。在以上条件下，作融解曲线分析，确认设计的定量引物的扩增效果，即无非特异扩增及引物二聚体。将 cDNA 模板稀释成一系列的浓度梯度进行扩增，制作标准曲线，并计算引物的扩增效率。

1.7 序列分析

核苷酸序列编辑和氨基酸序列的推导使用 DNAMAN 软件完成，同源性序列搜索由 NCBI 站点的 BLAST 完成，系统发育树的构建使用 MEGA5.0 软件完成。利用 ProtParam 软件分析编码蛋白的氨基酸序列的组成、相对分子质量、等电点等理化性质。用 ClustalX 1.83 进行多序列比对。

1.8 数据统计与分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$方法计算相对表达量，根据所得数据作柱形图。利用 SPSS18.0 软件对数据进行两个独立样本 *T* 检验（Independent-samples *T* Test）（$P < 0.05$）。

2 结果与分析

2.1 二斑叶螨成螨总 RNA 的提取和 PCR 扩增产物鉴定

提取二斑叶螨成螨总 RNA（图 1），检测总 RNA 的纯度与完整性。总 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8～2.2 之间，琼脂糖凝胶电泳检测显示具有 28S rRNA 和 18S rRNA 两条亮带，且二者之间的亮度比接近 2∶1，表明所提取的总 RNA 具有很好的完整性。采用特异性引物对 GST 基因进行 RT-PCR 扩增，得到

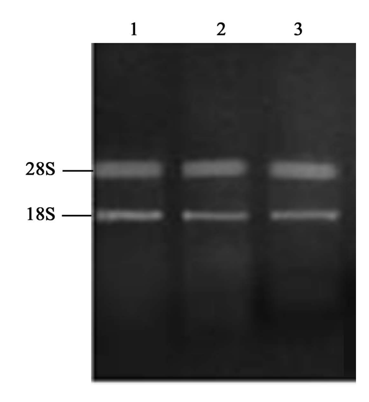


图 1　二斑叶螨成螨总 RNA 提取结果电泳图

Fig. 1　Agarose gel electrophoresis of total RNA from *Tetranychus urticae* adults

1：螺螨酯敏感品系 Spirodiclofen-susceptible strain；2－3：抗螺螨酯品系 Spirodiclofen-resistant strain.

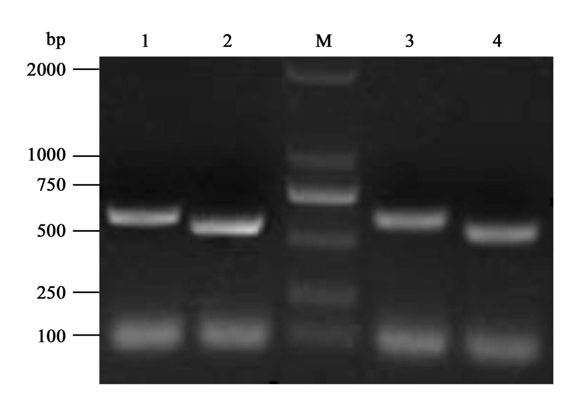


图 2　二斑叶螨成螨 GST 基因全长 PCR 扩增电泳

Fig. 2　Full-length cDNA verification of GST genes from *Tetranychus urticae* adults by PCR

M：DNA 分子量标准物 DNA marker；1－2：*GST*1；3－4：*GST*2.

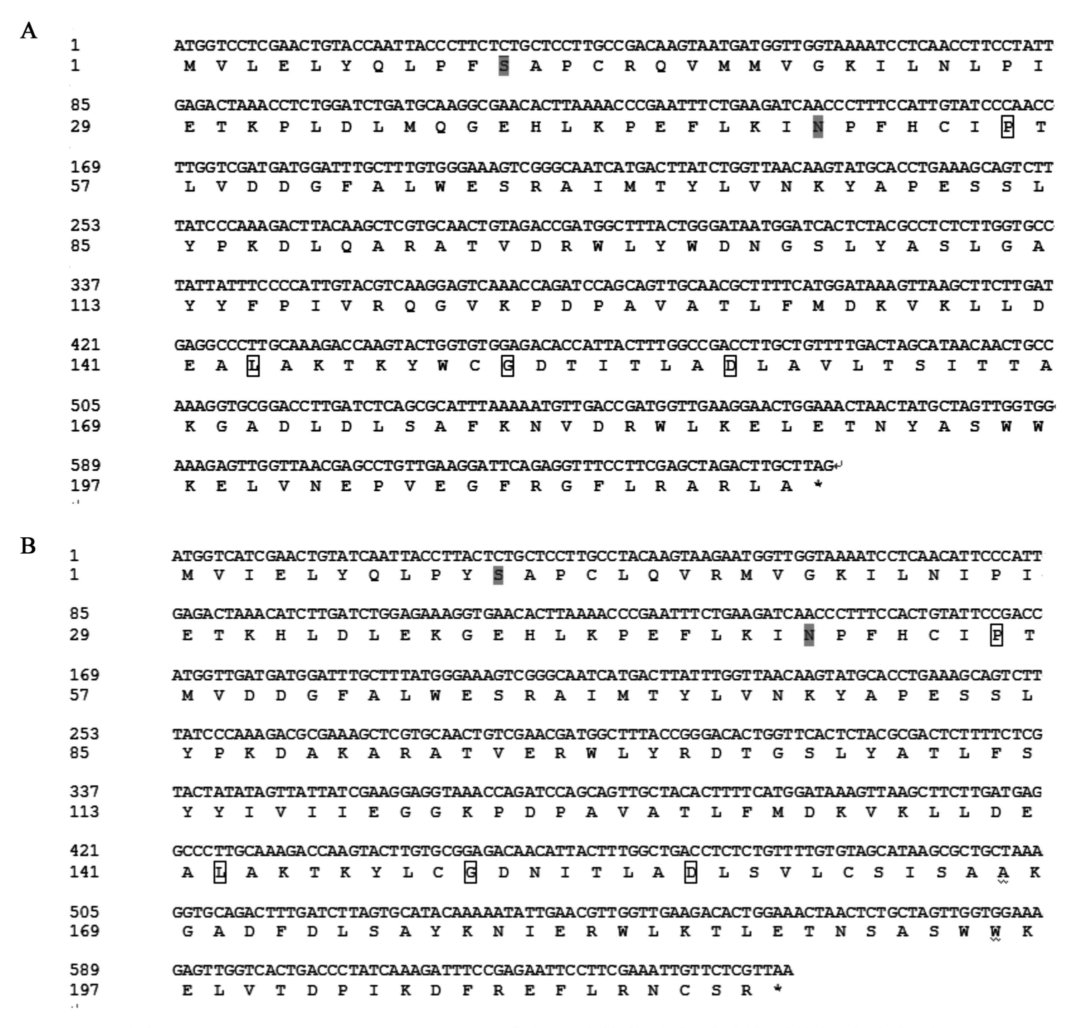


图 3　*TuGSTd*1（A）和 *TuGSTd*2（B）编码区的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 3　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *TuGSTd*1（A） and *TuGSTd*2（B） from *Tetranychus urticae* adults

灰色底纹代表催化关键残基，方框代表折叠关键残基。Catalytic critical residues are shaded in gray, while the folding critical residues are in box.

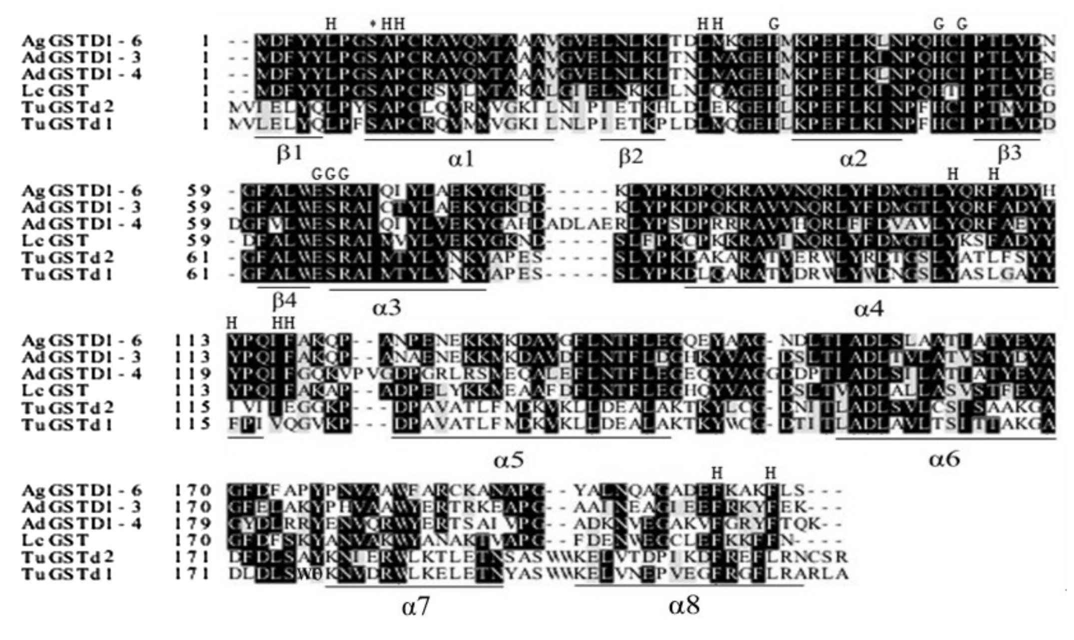


图 4　二斑叶螨 GSTs 与其他昆虫 GSTs 的多序列比对

Fig. 4　Amino acid alignment of GSTs from *Tetranychus urticae* and other insects

GSTs 序列的来源及 GenBank 登录号分别为 The origin of GSTs and their GenBank accession numbers：AgGST1-6：冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*，Q93113；AdGSTD1-4：大劣按蚊 *Anopheles dirus*，Q9GN60；AdGSTD1 – 3：大劣按蚊 *Anopheles dirus*，Q9GNE9；LcGST：铜绿蝇 *Lucilia cuprina*，P42860. 用 Clustal X 进行多序列比对，在 BoxShade 中标注。黑色阴影表示相同氨基酸，灰色阴影表示相似氨基酸，域值为 0.5。＊，G 和 H 分别表示催化的丝氨酸残基，谷胱甘肽结合位点(G-site) 和疏水位点(H-site)。α，α 螺旋、β，β 折叠、二级结构元件和保守位点参照冈比亚按蚊 AgGSTD1-6 进行标注。Sequences are aligned using Clustal X with default parameters, and then the alignments are shaded using BoxShade in such a way that identical residues are shaded in black and conserved ones in gray. The threshold fraction is set at 0.5. The catalytic residue Ser is marked with the asterisk. Residues involved in binding glutathione (G-site) are marked with G and those forming the hydrophobic site (H-site) with H. The secondary-structure elements are underlined and labeled (α-helices starting with α and β-strands with β). The labeling scheme for secondary-structure elements refers to that of AgGSTD1-6.

与预计大小相近的目的片段(图 2)。

2.2　二斑叶螨 GST 基因序列分析

二斑叶螨 GST1 和 GST2 基因 cDNA 均为 648 bp（GenBank 登录号：KC445659 和 KC445660），分别编码 215 和 215 个氨基酸的开放阅读框，起始密码子 ATG，终止密码子 TAA。暂命名为 *TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2。根据在线分析软件(http://web.expasy.org/)分析发现，由核苷酸推导的蛋白质分子式分别为 $C_{1130}H_{1743}N_{277}O_{311}S_9$ 和 $C_{1123}H_{1754}N_{280}O_{317}S_{10}$，理论分子量分别为 24.47 kDa 和 24.57 kDa，等电点分别为 5.49 和 6.33；N-端氨基酸为蛋氨酸(Met，M)，为稳定型氨基酸，半衰期大约 30 h，不稳定参数分别为 26.26 和 38.05。总的带负电荷的残基(Asp + Glu)分别为 26 和 28；总的带正电荷的残基(Arg + Lys)分别为 23 和 27。亲水性平均数分别为 –0.004 和 –0.091，预测这两个蛋白均为亲水性蛋白，并且其脂肪指数分别为 98.93 和 97.58。在二斑叶螨 Delta 家族 GST 基因中，S11 和 N49 代表形成 GSTs 催化域的关键残基，而 P55-L142-G150-D157 可能反映蛋白质折叠所形成的关键残基(图 3)。

2.3　二斑叶螨 GST 基因的二级结构与活性位点分析

目前，已有 4 个 Delta 家族的蛋白质晶体结构被解析(Wilce *et al*., 1995; Oakley *et al*., 2001; Chen *et al*., 2003)。本研究将二斑叶螨的两条 GST 基因的编码序列与结构清楚的 GSTs 进行多序列比对，了解二斑叶螨 GSTs 与其他昆虫 Delta 成员的蛋白质二级结构以及活性位点的异同。从图 4 中可知，二斑叶螨的 GSTs 与其他 GSTs 一样，包含 N 末端和 C 末端两个保守结构域。N 末端由 β-α-β-α-β-β-α 7 个结构基序组成，而 C 末端则由 5 个 α 螺旋构成。α 螺旋和 β 折叠结构内部没有插入和缺失。

2.4　二斑叶螨 GST 基因系统发育树的构建及同源性分析

目前，昆虫学研究者对 GST 基因 Delta 和

Epsilon 家族的研究相对较多，关于 GST 基因研究的目标昆虫目前主要集中在家蝇、果蝇和按蚊等。因此，在 GenBank 中对 GST 基因的氨基酸序列进行 Blast 同源性搜索，搜集了来自桔全爪螨 *Panonychus citri*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*、家蚕 *Bombyx mori*、豌豆蚜 *Acyrthosiphon pisum*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*、西方蜜蜂 *Apis mellifera* 等主要物种 Delta 家族的 GST 基因氨基酸序列，并结合获得的二斑叶螨两条 GST 基因的氨基酸序列，利用 Mega5.0 软件构建了 GST 基因的分子进化树(图 5)。结果表明该基因与桔全抓螨 Delta 家族的 GST 基因同源性为 93%。

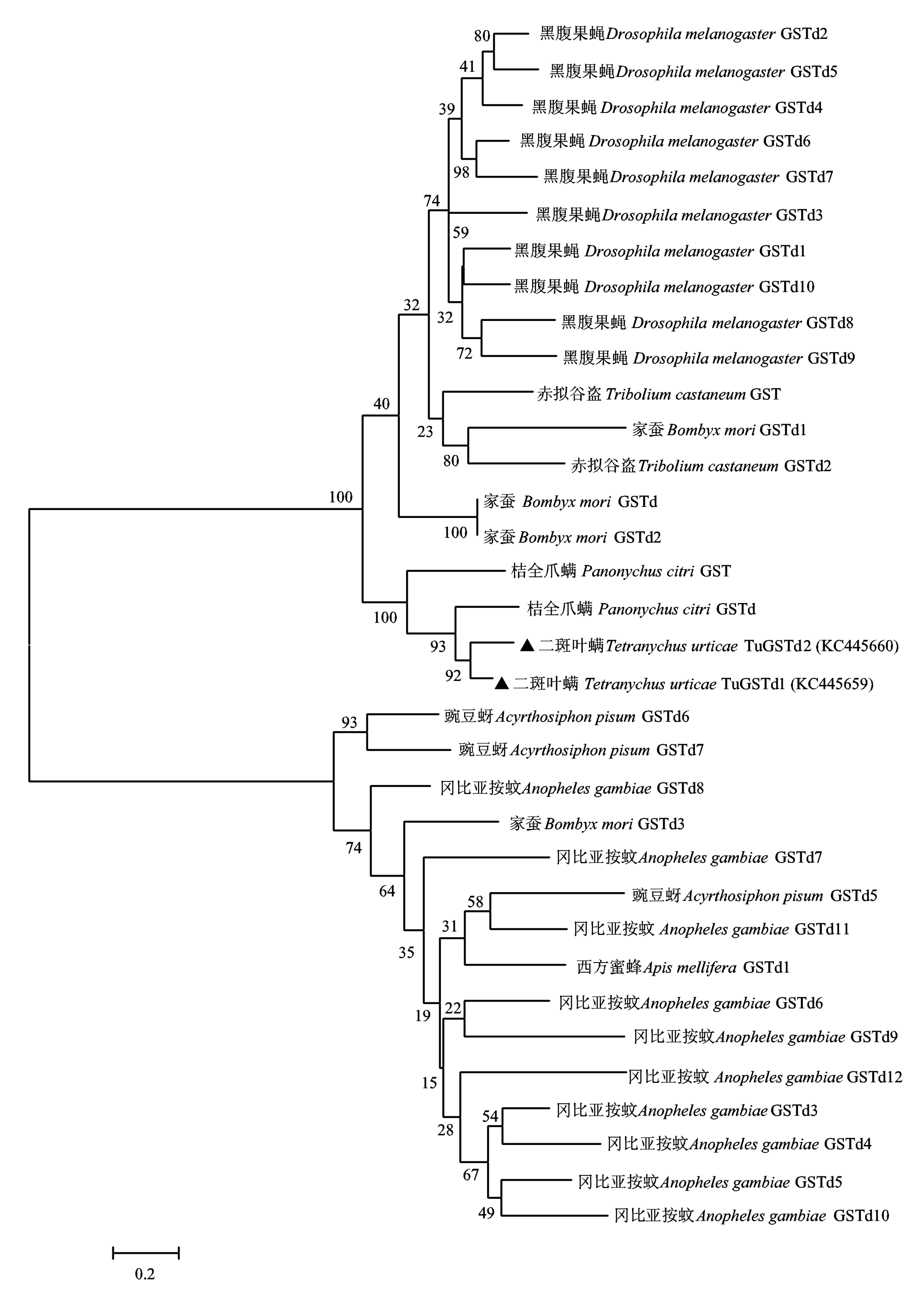


图 5　二斑叶螨 GSTs 与其他物种 GSTs 的系统发育树

Fig. 5　Phylogenetic tree of GSTs of *Tetranychus urticae* and other species based on amino acid sequence

标尺示遗传距离 Scale bar indicates the genetic distance.

2.5 二斑叶螨成螨 GST 基因在抗螺螨酯抗性品系与敏感品系中的表达

以 α-Tubulin 基因(高新菊, 2012)作为内参基因，分析 *TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2 在二斑叶螨敏感和抗螺螨酯品系中 mRNA 的表达量，敏感品系的比率值默认为 1，结果如图 6 所示。利用 SPSS18.0 软件对数据进行两个独立样本 *T* 检验(independent-samples *T* test)。结果表明，*TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2 在二斑叶螨抗性品系中的相对表达量分别是敏感品系的5.60 和 3.75 倍，均显著高于敏感品系($P<0.05$)(图 6)。

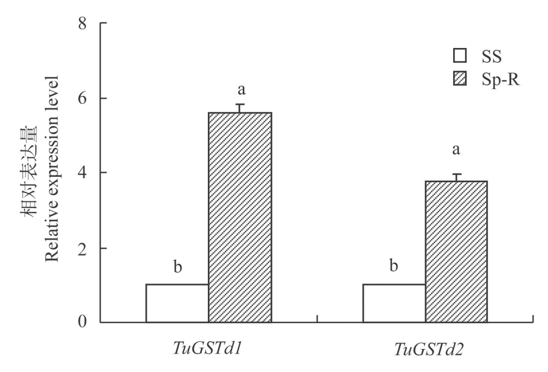


图 6 二斑叶螨抗性(Sp-R)与敏感(SS)品系 GST 基因的相对表达

Fig. 6 The relative expression levels of the GST genes in the spirodiclofen-resistant (Sp-R) and susceptible (SS) strains of *Tetranychus urticae* by real-time PCR analysis

以敏感品系中的表达量为基准；柱上不同字母表示抗性与敏感品系间基因表达存在显著差异(独立样本 *T* 检验，$P<0.05$)。The expression level in SS is set as 1. Different letters above bars indicate significant difference between the susceptible and resistant strains at the 0.05 level (independent-samples *T* test).

3 讨论

昆虫对杀虫剂产生抗性的机制主要包括表皮穿透率下降、作用靶标敏感性降低和解毒代谢作用增强等 3 个方面，其中解毒代谢作用增强是昆虫抗药性的主要机制(Hemingway *et al.*, 2004)。本研究通过 RT-PCR 技术克隆获得了两条 GST 基因，cDNA 全长均为 648 bp 的开放阅读框，分别编码 235 和 235 个氨基酸。系统发育分析表明该基因与桔全爪螨 *Panonychus citri* Delta 家族的 GST 基因的氨基酸序列一致性为 93%。这两个基因均归属于 Delta 家族，与其他物种 Delta 成员的氨基酸序列具有相似的二级结构，均由 N 末端和 C 末端功能域构成。N 末端由 β-α-β-α-β-β-α 7 个结构基序组成，而 C 末端则由 5 个 α 螺旋构成，α 螺旋和 β 折叠结构内部没有插入和缺失，其缺失和插入出现在 loop 区。而 Delta 家族在昆虫适应杀虫剂等逆境中起着重要作用(Lumjuan *et al.*, 2011)，在功能上主要行使对外源化合物的解毒代谢(Ranson *et al.*, 2001; Hemingway *et al.*, 2002)。以 α-Tubulin 基因作为内参基因对二斑叶螨敏感和抗螺螨酯品系的 GST 基因进行定量表达分析，结果表明，*TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2 在二斑叶螨抗性品系中的相对表达量与敏感品系相比，分别是其 5.60 和 3.75 倍，均显著高于敏感品系。GST 基因的表达量上调可能与抗性形成有关。

目前生理生化方面 GSTs 的活性增强与螨类抗药性的关系已有报道，在 mRNA 水平上，GSTs 的相对表达量在昆虫上的研究较多，但在螨类上的研究报道尚少。小菜蛾 *Plutella xylostella* 的 PxGST3 基因所编码的酶可以降解有机磷杀虫剂，它的表达量增加与抗性有关(Huang *et al.*, 1998)。果蝇的 GSTD1 基因在 DDT 抗性品系中表达量增加(Tang and Tu, 1995)。家蝇的 MdGST6A 基因在有机磷杀虫剂抗性品系中过量表达(Wei *et al.*, 2001)。在埃及伊蚊 DDT 抗性品系中，两个免疫特性上完全不同的 GST 基因都过量表达(Grant and Hammock, 1992)。Ranson 等(2001)研究发现在冈比亚按蚊抗性品系中Ⅲ类 GSTs aggst322 基因过量表达 5 倍，表达的重组酶可以降解 DDT。一个 DDT 抗性品系中有多个 Epsilon 类 GST 基因过量表达(Ortelli *et al.*, 2003)。根据二斑叶螨基因组 GST 家族的相关信息，Delta 家族 GSTs 有 16 个，为最多的家族，其次为 Mu 家族，为 12 个(Grbic *et al.*, 2011)，这两个家族的基因可能均参与了抗性解毒。而本实验只涉及到 Delta 家族的 2 个基因的 mRNA 相对表达量的研究，初步明确了 *TuGSTd*1 和 *TuGSTd*2 表达上调可能参与了二斑叶螨抗螺螨酯品系的解毒代谢，但是本研究还不能确定二斑叶螨中 GSTs 家族中有多少基因在起作用。因此，今后的研究将会涉及到其他的 Delta 家族或 Mu 家族成员的基因表达，通过筛选将会获得更多的 GSTs 功能基因。

参考文献(References)

Chelvanayagam G, Parker MW, Board PG, 2001. Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chem. Biol. Interact.*, 133: 256-260.

Chen L, Hall PR, Zhou XE, Ranson H, Hemingway J, Meehan EJ, 2003. Structure of an insect delta-class glutathione S-transferase

from a DDT-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 59(12): 2211 – 2217.

Duan XL, Zhang ZG, Gao XJ, Shen HM, 2011. Selection of *Tetranychus urticae* resistant to fenpropathrin and spirodiclofen and the synergistic action of the synergists to the resistant population. *Plant Protection*, 37(5): 106 – 109. [段辛乐, 张志刚, 高新菊, 沈慧敏, 2011. 二斑叶螨对甲氰菊酯和螺螨酯的抗性选育及增效剂的增效作用. 植物保护, 37(5): 106 – 109]

Fu HB, Zhang ZG, Shen HM, Yang SY, 2011. Biological fitness of the spirodiclofen-resistant and sensitive populations of *Tetranychus urticae*. *Plant Protection*, 37(5): 115 – 117. [付海波, 张志刚, 沈慧敏, 杨顺义, 2011. 二斑叶螨对螺螨酯抗性和敏感种群相对适合度的研究. 植物保护, 37(5): 115 – 117]

Gao XJ, 2012. Research on Resistance Molecular Mechanism of *Tetranychus urticae* Koch to Fenpropathrin. PhD Dissertation, Gansu Agricultural University, Lanzhou. [高新菊, 2012. 二斑叶螨对甲氰菊酯的抗性分子机理研究. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文]

Grant DF, Hammock BD, 1992. Genetic and molecular evidence for a *trans*-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol. Gen. Genet.*, 234: 169 – 176.

Grbic M, Van Leeuwen T, Clark RM, Rombauts S, Rouze P, Grbic V, Osborne EJ, Dermauw W, Ngoc PC, Ortego F, Hernandez-Crespo P, Diaz I, Martinez M, Navajas M, Sucena E, Magalhaes S, Nagy L, Pace RM, Djuranovic S, Smagghe G, Iga M, Christiaens O, Veenstra JA, Ewer J, Villalobos RM, Hutter JL, Hudson SD, Velez M, Yi SV, Zeng J, Pires-daSilva A, Roch F, Cazaux M, Navarro M, Zhurov V, Acevedo G, Bjelica A, Fawcett JA, Bonnet E, Martens C, Baele G, Wissler L, Sanchez-Rodriguez A, Tirry L, Blais C, Demeestere K, Henz SR, Gregory TR, Mathieu J, Verdon L, Farinelli L, Schmutz J, Lindquist E, Feyereisen R, Van de Peer Y, 2011. The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature*, 479: 487 – 492.

Hemingway J, Field L, Vontas J, 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*, 298: 96 – 97.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 653 – 665.

Huang HS, Hu NT, Yao YE, Wu CY, Chiang SW, Sun CN, 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28(9): 651 – 658.

Ketterman AJ, Saisawang C, Wongsantichon J, 2011. Insect glutathione transferases. *Drug Metab. Rev.*, 43(2): 253 – 265.

Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara LA, Somboon P, Lycett G, Ranson H, 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41: 203 – 209.

Niu JZ, Dou W, Wang BJ, Zhang GN, Zhang R, Yin Y, Wang JJ, 2012. Purification and partial characterization of glutathione S-transferases from three field populations of *Panonychus citri*. *Exp. Appl. Acarol.*, 56: 99 – 111.

Oakley AJ, Harnnoi T, Udomsinprasert R, Jirajaroenrat K, Ketterman AJ, Wilce MC, 2001. The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1-4 from *Anopheles dirus* species B. *Protein Science*, 10(11): 2176 – 2185.

Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J, 2003. Heterologous expression of four glutathione S-transferase genes genetically linked to a major insecticide-resisitance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 373: 957 – 963.

Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J, 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.*, 359: 295 – 304.

Rauch N, Nauen R, 2003. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 74: 91 – 101.

Tang AH, Tu CP, 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *J. Biol. Chem.*, 269: 27876 – 27884.

Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Khajehali J, Tirry L, 2009. Genetic and biochemical analysis of a laboratory-selected spirodiclofen-resistant strain of *Tetranychus urticae* Koch. *Pest Management Science*, 65: 358 – 366

Wei SH, Clark AG, Syvanen M, 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(12): 1145 – 1153.

Wilce MC, Board PG, Feil SC, Parker MW, 1995. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J.*, 14(10): 2133 – 2143.

Yu QY, Fang SM, Zuo WD, Zhang Z, Lu C, 2010. Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression characterization of glutathion-S-transferase gene *BmGSTz*1 in *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 53(10): 1061 – 1068. [余泉友, 房守敏, 左伟东, 张泽, 鲁成, 2010. 家蚕谷胱甘肽-S-转移酶基因 BmGSTz1 的克隆、序列分析及组织表达特征. 昆虫学报, 53(10): 1061 – 1068]

（责任编辑：赵利辉）